





© BSN 2011

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan Normatif.....	1
3 Istilah dan definisi .....	1
4 Komposisi .....	2
6 Pengambilan contoh .....	3
7 Cara uji .....	3
8 Syarat lulus uji .....	3
9 Higiene.....	4
10 Pengemasan.....	4
11 Syarat Penandaan .....	4
Lampiran A (normatif) Cara uji biskuit.....	5
Bibliografi .....	41
Tabel 1 - Syarat Mutu .....	2
Tabel A.1 - Reaksi biokimia <i>Escherichia Coli</i> pada uji IMVIC.....	25
Tabel A.2 - APM/g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL contoh .....	25
Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk <i>Salmonella sp.</i> ....	33
Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non <i>Salmonella sp.</i> .....	34
Gambar A.1. Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer <i>Butterfield's phosphate Buffered Dilution Water (BPB)</i> .....	19



## Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) biskuit ini merupakan revisi dari SNI 01-2973-1992 *Biskuit*.

Standar ini dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut :

- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri biskuit.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada :

- 1 Undang-undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
- 2 Undang-undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
- 3 Undang-undang Republik Indonesia No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
- 4 Undang-undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
- 5 Peraturan Pemerintah No.69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
- 6 Peraturan Pemerintah No.28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
- 7 Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (GMP).
- 8 Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Daur Ulang Pada Kemasan Pangan dari Plastik.
- 9 Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 722/Menkes/Per/IX/1988 tentang Bahan Tambahan Makanan dan revisinya.
- 10 Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
- 11 Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67-04, Makanan dan Minuman, Kementerian Perindustrian yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 12 Oktober 2010 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 27 April 2011 sampai dengan tanggal 26 Juni 2011 dengan hasil akhir RASNI.



## Biskuit

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji biskuit.

Standar ini berlaku juga untuk produk krekers, kukis, wafer dan pai.

### 2 Acuan Normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*

### 3 Istilah dan definisi

#### 3.1

##### **biskuit**

produk bakeri kering yang dibuat dengan cara memanggang adonan yang terbuat dari tepung terigu dengan atau tanpa substitusinya, minyak/lemak, dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan

#### 3.2

##### **krekers**

jenis biskuit yang dalam pembuatannya memerlukan proses fermentasi atau tidak, serta melalui proses laminasi sehingga menghasilkan bentuk pipih dan bila dipatahkan penampangnya tampak berlapis-lapis

#### 3.3

##### **kukis**

Jenis biskuit yang terbuat dari adonan lunak, renyah dan bila dipatahkan penampangnya tampak bertekstur kurang padat

#### 3.4

##### **wafer**

jenis biskuit yang dibuat dari adonan cair, berpori-pori kasar, renyah dan bila dipatahkan penampangnya tampak berongga

#### 3.5

##### **pai**

jenis biskuit berserpih (*flaky*) yang dibuat dari adonan dilapis dengan lemak padat atau emulsi lemak, sehingga mengembang selama pemanggangan dan bila dipatahkan penampangnya tampak berlapis-lapis

Yang termasuk pai adalah puff



## 4 Komposisi

### 4.1 Bahan baku utama

Tepung terigu dan minyak/lemak.

### 4.2 Bahan pangan lain

Bahan pangan yang diizinkan untuk biskuit sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

### 4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk makanan sesuai dengan peraturan yang berlaku.

## 5 Syarat mutu

Syarat mutu biskuit sesuai Tabel 1 di bawah ini.

**Tabel 1 - Syarat Mutu**

No	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	normal
1.2	Rasa	-	normal
1.3	Warna	-	normal
2	Kadar air (b/b)	%	maks. 5
3	Protein (N x 6,25) (b/b)	%	min. 5 min. 4,5 <sup>*)</sup> min. 3 <sup>**)</sup>
4	Asam lemak bebas (sebagai asam oleat) (b/b)	%	maks. 1,0
5	Cemaran logam		
5.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,5
5.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
5.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40
5.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,05
6	Arsen (As)	mg/kg	maks. 0,5
7	Cemaran mikroba		
7.1	Angka Lempeng Total	koloni/g	maks. $1 \times 10^4$
7.2	<i>Coliform</i>	APM/g	20
7.3	<i>Eschericia coli</i>	APM/g	< 3



Tabel 1 - Syarat Mutu (lanjutan)

No	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan
7.4	<i>Salmonella sp.</i>	-	negatif/ 25 g
7.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/ g	maks. $1 \times 10^2$
7.6	<i>Bacillus cereus</i>	koloni/g	maks. $1 \times 10^2$
7.7	Kapang dan khamir	koloni/g	maks. $2 \times 10^2$
<b>CATATAN :</b> *) untuk produk biskuit yang dicampur dengan pengisi dalam adonan **) untuk produk biskuit yang diberi pelapis atau pengisi ( <i>coating/ filling</i> ) dan pai			

## 6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

## 7 Cara uji

Cara uji untuk biskuit seperti di bawah ini :

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
  - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
  - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
  - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.3
- c) Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3
- d) Cara uji protein sesuai Lampiran A.4
- e) Cara uji asam lemak bebas (sebagai asam oleat) sesuai Lampiran A.5
- f) Cara uji cemaran logam sesuai lampiran A.6
  - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.6.1
  - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.6.2
  - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.6.3
- g) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.7
- h) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.8
  - Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, *Coliform*, *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, kapang dan khamir sesuai Lampiran A.8.1
  - Cara uji Angka lempeng total sesuai Lampiran A.8.2
  - Cara Uji *Coliform* dan *Eschericia coli* sesuai Lampiran A.8.3
  - Cara uji *Salmonella sp.* sesuai Lampiran A.8.4
  - Cara uji *Staphylococcus aureus* sesuai Lampiran A.8.5
  - Cara uji *Bacillus cereus* sesuai Lampiran A.8.6
  - Cara uji kapang dan khamir sesuai Lampiran A.8.7

## 8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila telah memenuhi persyaratan mutu sesuai Pasal 5.



## **9 Higiene**

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

## **10 Pengemasan**

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

## **11 Syarat Penandaan**

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.





## **Lampiran A** (normatif) **Cara uji biskuit**

### **A.1 Persiapan contoh**

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik dan analisis kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh uji organoleptik dan analisa kimia.

#### **A.1.1 Persiapan contoh uji mikrobiologi**

Buka kemasan biskuit secara aseptik dan ambil contoh biskuit sebanyak 500 g dan tempatkan dalam botol contoh steril.

#### **A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik**

Buka kemasan biskuit dan ambil contoh biskuit secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

#### **A.1.3 Persiapan contoh untuk analisis kimia**

Buka kemasan biskuit dan ambil contoh biskuit sebanyak 500 g dan tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

### **A.2 Keadaan**

#### **A.2.1 Bau**

##### **A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman (hidung) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih dan kompeten untuk pengujian organoleptik.

##### **A.2.1.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji secukupnya, dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

##### **A.2.1.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "normal" dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".



## A.2.2 Rasa

### A.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera perasa (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih dan kompeten untuk pengujian organoleptik.

### A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dengan menggunakan sendok yang bersih;
- b) rasakan contoh uji dengan lidah;
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

### A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika rasa contoh sesuai dengan rasa biskuit, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika rasa contoh tidak sesuai dengan rasa biskuit, maka hasil dinyatakan "tidak normal."

## A.2.3 Warna

### A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan (mata) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih/kompeten dalam pengujian organoleptik.

### A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya, dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) amati contoh uji untuk mengetahui warnanya; dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

### A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika bewarna khas biskuit, maka hasil dinyatakan "khas biskuit", dan
- b) jika terlihat selain khas warna biskuit, maka hasil dinyatakan sesuai dengan warna yang diamati.

## A.3 Kadar air

### A.3.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu 130 °C selama 1 jam.

### A.3.2 Peralatan

- a) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Desikator yang berisi desikan;
- d) Botol timbang aluminium dengan penutup Ø 5 cm, tinggi 3 cm.

### A.3.3 Cara kerja

- a) Panaskan botol timbang beserta tutupnya dalam oven pada suhu  $(130 \pm 3)$  °C selama satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 30 menit kemudian timbang ( $W_0$ );
- b) masukan 2 g contoh ke dalam cawan, tutup dan timbang ( $W_1$ );



- c) panaskan botol timbang yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka di dalam oven pada suhu  $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$  selama satu jam;
- d) tutup botol timbang ketika masih di dalam oven, kemudian pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 30 menit kemudian timbang ( $W_2$ );
- e) lakukan pekerjaan duplo; dan
- f) hitung kadar air dalam contoh.

#### A.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

##### Keterangan :

$W_0$  adalah bobot botol timbang dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

$W_1$  adalah bobot botol timbang, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

$W_2$  adalah bobot botol timbang, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (RSD) maksimal 2%. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau deviasi lebih besar dari 2% maka analisis harus diulang kembali.

### A.4 Protein ( $N \times 6,25$ )

#### A.4.1 Prinsip

Senyawa nitrogen dirubah menjadi amonium sulfat oleh  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, kemudian diuraikan dengan NaOH. Amoniak yang dibebaskan diikat dengan asam borak dan kemudian dititar dengan larutan baku asam. Kadar protein diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,25.

#### A.4.2 Peralatan

- a) Neraca analitik, terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) Labu *Kjedahl* 100 mL;
- c) Alat destilasi *Kjedahl*;
- d) Alat penyuling dan kelengkapannya;
- e) Pemanas listrik;
- f) Labu ukur terkalibrasi;
- g) Beaker gelas;
- h) Buret 10 mL, terkalibrasi;
- i) Batu didih.

#### A.4.3 Pereaksi

- a) Asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat bebas nitrogen;
- b) Larutan katalis tembaga,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  bebas nitrogen 0,05g/mL  $\text{H}_2\text{O}$ ;
- c) Katalis selen:  
Campuran 4 g serbuk  $\text{SeO}_2$ , 150 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  atau  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dan 30 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;
- d) Kalium sulfat,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  bebas nitrogen;
- e) Batu didih;
- f) Indikator *methyl red* (MR)/*bromocresol green* (BCG);  
Larutkan 0,2 g *metyl red* dengan etanol 95% menjadi 100 mL.



- Larutkan 1,0 g *bromocresol green* dengan etanol 95% menjadi 100 mL. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.;
- g) Larutan asam borat,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 4 %:  
Larutkan 40 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  dengan air suling menjadi 1000 mL dan tambahkan 3 mL larutan indikator *methyl red-bromocresol green*, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas;
- h) Larutan natrium hidroksida  $\text{NaOH}$  30%;  
Larutkan 600 g natrium hidroksida dengan air suling menjadi 2000 mL, simpan dalam botol bertutup karet;
- i) Larutan indikator fenolftalein (PP) 1%;  
Larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95% dan encerkan menjadi 100 mL;
- j) Larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  0,01N  
Pipet 1 mL asam klorida pekat dan encerkan menjadi 1000 mL dengan air suling sampai tanda garis dan tetapkan normalitasnya.

#### A.4.4 Cara kerja

- a) Timbang 1 g sampai dengan 5 g contoh (W) ke dalam labu Kjeldahl, tambahkan 15,00 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 1 mL larutan katalis  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  atau 1 g campuran selen, 8 butir sampai dengan 10 butir batu didih dan 25 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;
- b) panaskan campuran di atas pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijauan-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat dekstruksi dengan unit pengisap asap;
- c) biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- d) tambahkan 75 mL larutan  $\text{NaOH}$  30 % (periksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa);
- e) suling selama menit sampai dengan 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 mL, dengan penampung destilat adalah 50 mL larutan  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4%;
- f) bilas ujung pendingin dengan air suling;
- g) titar larutan campuran destilat dengan larutan  $\text{HCl}$  0,01N; dan
- h) kerjakan penetapan blanko.

#### A.4.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (N x 6,25) (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 6,25}{W} \times 100\%$$

##### Keterangan :

- $V_1$  adalah volume  $\text{HCl}$  0,01 N untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 $V_2$  adalah volume  $\text{HCl}$  0,01 N untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 N adalah normalitas larutan  $\text{HCl}$ ;  
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg);  
 14,007 adalah bobot atom Nitrogen;  
 6,25 adalah faktor protein.

#### A.4.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil kadar protein. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka analisis harus diulang kembali.



## A.5 Asam lemak bebas (sebagai asam oleat)

### A.5.1 Prinsip

Pelarutan contoh dalam pelarut organik dan dinetralkan dengan larutan basa (kalium hidroksida atau natrium hidroksida)

### A.5.2 Peralatan

- Alat Soxhlet lengkap;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas air;
- Buret 10 mL atau 50 mL, terkalibrasi;
- Erlenmeyer 250 mL, yang dilengkapi dengan pendingin refluks

### A.5.3 Pereaksi

- Petroleum eter;
- Etanol netral;  
etanol 95 % ditambah dengan beberapa tetes indikator pp dan di titar dengan NaOH 0,1N sampai terbentuk warna merah muda.
- Indikator fenolftalein (pp) 1%; dan  
Larutkan 1 g fenolftalein dengan etanol 95% ke dalam labu ukur 100 mL kemudian tepatkan sampai tanda garis.
- Larutan kalium hidroksida, KOH 0,1 N atau larutan Larutan natrium hidroksida, NaOH 0,1 N dalam etanol yang telah distandardisasi.

### A.5.4 Cara Kerja

- Ekstrak 10 g contoh (m) dengan pelarut petroleum eter selama 16 jam dengan alat Soxhlet;
- uapkan di atas penangas air sampai pelarut menguap semuanya dan tertinggal residu lemak;
- larutkan dengan 50 mL etanol panas yang telah dinetralkan;
- tambahkan 2 mL larutan fenolftalein sebagai indikator; dan
- titrasi larutan tersebut dengan KOH 0,1N atau NaOH 0,1N sampai terbentuk warna merah muda.

### A.5.5 Perhitungan

$$\text{Asam lemak bebas (sebagai asam oleat) (\% )} = \left[ \frac{28,2 \times V \times N}{m} \right] \times 100\%$$

#### Keterangan:

- V adalah volume KOH atau NaOH yang diperlukan dalam penitrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
N adalah normalitas larutan KOH atau NaOH, dinyatakan dalam normal (N);  
W adalah bobot contoh yang diuji, dinyatakan dalam gram (g)

### A.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kadar asam lemak bebas. Jika kisaran lebih besar dari 10 %, maka analisis harus diulang kembali.



## A.6 Cemaran logam

### A.6.1 Penetapan cemaran logam kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

#### A.6.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 550 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimum 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

#### A.6.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas listrik;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL, terkalibrasi;
- Gelas ukur kapasitas 10 mL terkalibrasi;
- Gelas piala 250 mL;
- Cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 mL - 100 mL; dan
- Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* sebesar 20-25 µm.

#### A.6.1.3 Pereaksi

- Larutan asam nitrat, HNO<sub>3</sub> pekat (65 %, Bj 1,4);
- Larutan asam klorida, HCl pekat (37 %, Bj 1,19);
- Larutan asam nitrat, HNO<sub>3</sub> 0,1 N;  
encerkan 7 mL HNO<sub>3</sub> 65 % dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- Larutan asam klorida, HCl 6 N;  
encerkan 500 mL HCl 37 % dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- Larutan baku 1 000 µg/mL Cd;  
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO<sub>3</sub> pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 µg/mL siap pakai.
- Larutan baku 100 µg/mL Cd;  
pipet 10 mL larutan baku 1 000 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 µg/mL Cd.
- Larutan baku kerja Cd;  
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL; 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; 0,5 mL dan 0,6 mL larutan baku 100 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO<sub>3</sub> 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,3 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,5 µg/mL dan 0,6 µg/mL Cd.
- Larutan baku 1 000 µg/mL Pb;  
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO<sub>3</sub> pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 µg/mL siap pakai.
- Larutan baku 50 µg/mL Pb; dan



pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 µg/mL Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/mL.

- j) Larutan baku kerja Pb;  
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL; 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO<sub>3</sub> 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL dan 2,0 µg/mL Pb.

#### A.6.1.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (W) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa;
- tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- lanjutkan pengabuan dalam tanur (550 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO<sub>3</sub> pekat kira-kira 1 mL sampai dengan 3 mL;
- keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 450 °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO<sub>3</sub> pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO<sub>3</sub> 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention* liquid sebesar 20-25 µm, ke dalam wadah *polypropylene*;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 283 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- hitung kandungan logam dalam contoh.

#### A.6.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan Pb (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

##### Keterangan :

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam (µg/mL);  
V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.6.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang.



## A.6.2 Penetapan timah (Sn)

### A.6.2.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan  $\text{HNO}_3$  dan  $\text{HCl}$  kemudian tambahkan  $\text{KCl}$  untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$ .

### A.6.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer serapan atom beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn), terkalibrasi;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Erlenmeyer 250 mL terkalibrasi;
- Penangas listrik;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian  $1^\circ\text{C}$
- Pipet ukur berskala 0,1 mL kapasitas 5 mL dan 10 mL, terkalibrasi;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL, terkalibrasi
- Gelas ukur kapasitas 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala 250 mL, dan
- Penangas air.

### A.6.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida, 10 mg/mL  $\text{KCl}$ ;  
larutkan 1,91 g  $\text{KCl}$  dengan air menjadi 100 mL;
- Asam nitrat pekat,  $\text{HNO}_3$  pekat ;
- Asam klorida pekat,  $\text{HCl}$  pekat;
- Larutan baku 1 000 mg/L Sn; dan  
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL  $\text{HCl}$  pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn.  
Pipet 10 mL  $\text{HCl}$  pekat dan 1,0 mL larutan  $\text{KCl}$  ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL; dan 2,5 mL larutan baku 1 000 mg/L Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/mL}$ ; 15  $\mu\text{g/mL}$ ; 15  $\mu\text{g/mL}$ ; 20  $\mu\text{g/mL}$ ; dan 25  $\mu\text{g/mL}$  Sn.

### A.6.2.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (W) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuk arang;
- angkat erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 mL  $\text{HCl}$  pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap  $\text{Cl}_2$  berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling;
- tambahkan 1,0 mL  $\text{KCl}$ , dinginkan pada temperatur ruang, tara dengan air suling dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;



- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $N_2O-C_2H_2$ ;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh;

#### A.6.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

##### Keterangan :

C adalah konsentrasi Sn dari kurva kalibrasi, ( $\mu\text{g/mL}$ )

V adalah volume larutan akhir, (mL);

W adalah bobot contoh, (g)

#### A.6.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16% maka analisis harus diulang kembali

#### A.6.3 Penetapan merkuri (Hg)

##### A.6.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

##### A.6.3.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG");
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Labu destruksi 250 mL;
- d) Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm -18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Rasching* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- e) Labu ukur 100 mL, 500 mL, dan 1 000 mL terkalibrasi;
- f) Penangas listrik;
- g) Gelas ukur 25 mL terkalibrasi; dan
- h) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi.

##### A.6.3.3 Pereaksi

- a) Asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 M;
- b) Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  7 M;
- c) Batu didih;
- d) Campuran  $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$  (1:1);
- e) Hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$
- f) Larutan natrium molibdat 2 %



- g) Larutan pereduksi;  
campurkan 50 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15g hidroksilamin sulfat, dan 25g  $\text{SnCl}_2$ . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) Larutan  $\text{NaBH}_4$ ;  
larutkan 3 g serbuk  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL;
- i) Larutan pengencer :  
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling ke dalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL  $\text{HNO}_3$  kemudian 67 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- j) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Hg;  
larutkan 0,135 4 g  $\text{HgCl}_2$  dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- k) Larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  Hg; dan  
pipet 1 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$ .
- l) Larutan baku kerja Hg;  
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/L}$  ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$  Hg.

#### A.6.3.4 Cara kerja

##### A.6.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9M, 20 mL  $\text{HNO}_3$  7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2%, dan 5 batu didih sampai dengan 6 batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 mL campuran  $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$  (1:1) melalui pendingin;
- d) panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu kamar;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- i) pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;



- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.

#### A.6.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO<sub>3</sub>, 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam oven microwave dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh.

#### A.6.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan Hg(mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

##### Keterangan:

C : konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam (µg/mL)  
 V : volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 W: bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);  
 fp : faktor pengenceran.

#### A.6.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16% maka analisis harus diulang kembali.

### A.7 Cemar arsen (As)

#### A.7.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As<sup>5+</sup> direduksi dengan KI menjadi As<sup>3+</sup> dan direaksikan dengan NaBH<sub>4</sub> atau SnCl<sub>2</sub> sehingga terbentuk AsH<sub>3</sub> yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

#### A.7.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Labu Kjeldahl 250 mL;
- d) Labu ukur 50 mL, 100 mL, 500 mL, dan 1 000 mL terkalibrasi;
- e) Pemanas listrik;
- f) Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;



- g) Cawan porselen kapasitas 50 mL;
- h) Gelas ukur 25 mL terkalibrasi;
- i) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C;
- j) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi dan;
- k) Labu borosilikat berdasar bulat 50 mL.

### A.7.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat
- b) Asam perklorat,  $\text{HClO}_4$  pekat
- c) Natrium boronhidrida,  $\text{NaBH}_4$   
larutkan 3 g  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.
- d) Asam klorida,  $\text{HCl}$  8 M  
larutkan 66 mL  $\text{HCl}$  37 % ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) Timah (II) klorida,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 %  
timbang 50 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke dalam piala gelas 200 mL dan tambahkan 100 mL  $\text{HCl}$  37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) Kalium iodida,  $\text{KI}$  20 %  
timbang 20 g  $\text{KI}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- g) Larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  75 mg/mL  
larutkan 3,75 g  $\text{MgO}$  dengan 30 mL  $\text{H}_2\text{O}$  secara hati-hati, tambahkan 10 mL  $\text{HNO}_3$ , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling
- h) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  As  
larutkan 1,320 3 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dengan sedikit  $\text{NaOH}$  20 % dan netralkan dengan  $\text{HCl}$  atau  $\text{HNO}_3$  1:1 (1 bagian asam: 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan baku 100  $\mu\text{g/mL}$  As  
pipet 10 mL larutan baku arsen 1 000  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- j) Larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  As; dan  
pipet 1 mL larutan standar arsen 100 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$  As.
- k) Larutan baku kerja As;  
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,04  $\mu\text{g/mL}$  dan 0,05  $\mu\text{g/mL}$  As.

### A.7.4 Cara kerja

#### A.7.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai 10 g contoh (W) ke dalam labu Kjeldhal 250 mL, tambahkan 5 mL sampai 10 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dan 4 mL sampai 8 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan  $\text{HNO}_3$  pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL  $\text{HClO}_4$  70% sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit  $\text{HNO}_3$  pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL  $\text{H}_2\text{O}$  dan 5 mL amonium oksalat jenuh;



- e) panaskan sehingga timbul uap  $\text{SO}_3$  di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- g) pipet 25 mL larutan di atas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M; 0,1 mL KI 20% kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi ( $\text{NaBH}_4$ ) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

#### A.7.4.2 destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL  $\text{HNO}_3$ , 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam oven microwave dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- d) pipet 10 mL larutan destruksi (C) ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , uapkan di atas penangas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu  $450^\circ\text{C}$  ( $\pm 1$  jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan  $\text{NaBH}_4$  dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$ , 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,04  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,05  $\mu\text{g/mL}$  serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbansi tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh

#### A.7.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

##### Keterangan :

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi ,dinyatakan dalam ( $\mu\text{g/mL}$ );

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL) ;

W adalah bobot contoh , dinyatakan dalam gram (g);

fp adalah faktor pengenceran.



### A.7.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

## A.8 Cemaran mikroba

### A.8.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, *Eschericia coli*, *Bacillus cereus*, Kapang dan Khamir

#### A.8.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

#### A.8.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 – 12 000 rpm;
- Otoklaf terkalibrasi;
- Penangas listrik;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Gelas piala steril;
- Labu erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 1,0 mL dan 10,0 mL terkalibrasi;
- Tabung reaksi;
- Spatula steril;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL, 500 mL, dan 1 000 mL terkalibrasi dan;
- Penangas listrik.

#### A.8.1.3 Larutan Pengencer

*Butterfield* phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  34 g
- air suling 500 mL

Atur pH dengan NaOH sehingga pH 7,2 tepatkan volume 1 000 mL dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Simpan pada refrigerator untuk membuat larutan pengencer 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL, kemudian dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan ke dalam tabung reaksi sebanyak  $(9 \pm 1)$  mL dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

#### A.8.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- Kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

### A.8.2 Angka lempeng total (metode *plate count*)

#### A.8.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu  $(35 \pm 1)$  °C.



### A.8.2.2 Peralatan

- Inkubator ( $35 \pm 1$ ) °C terkalibrasi;
- oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- otoklaf terkalibrasi;
- penangas air bersirkulasi ( $45 \pm 1$ ) °C;
- cawan petri gelas/plastik diameter 15 mm x 90 mm steril;
- pipet ukur 1 mL, 5 mL, dan 10 mL steril terkalibrasi; dan
- alat penghitung koloni (*colony counter*).

### A.8.2.3 Pembenihan dan pengencer

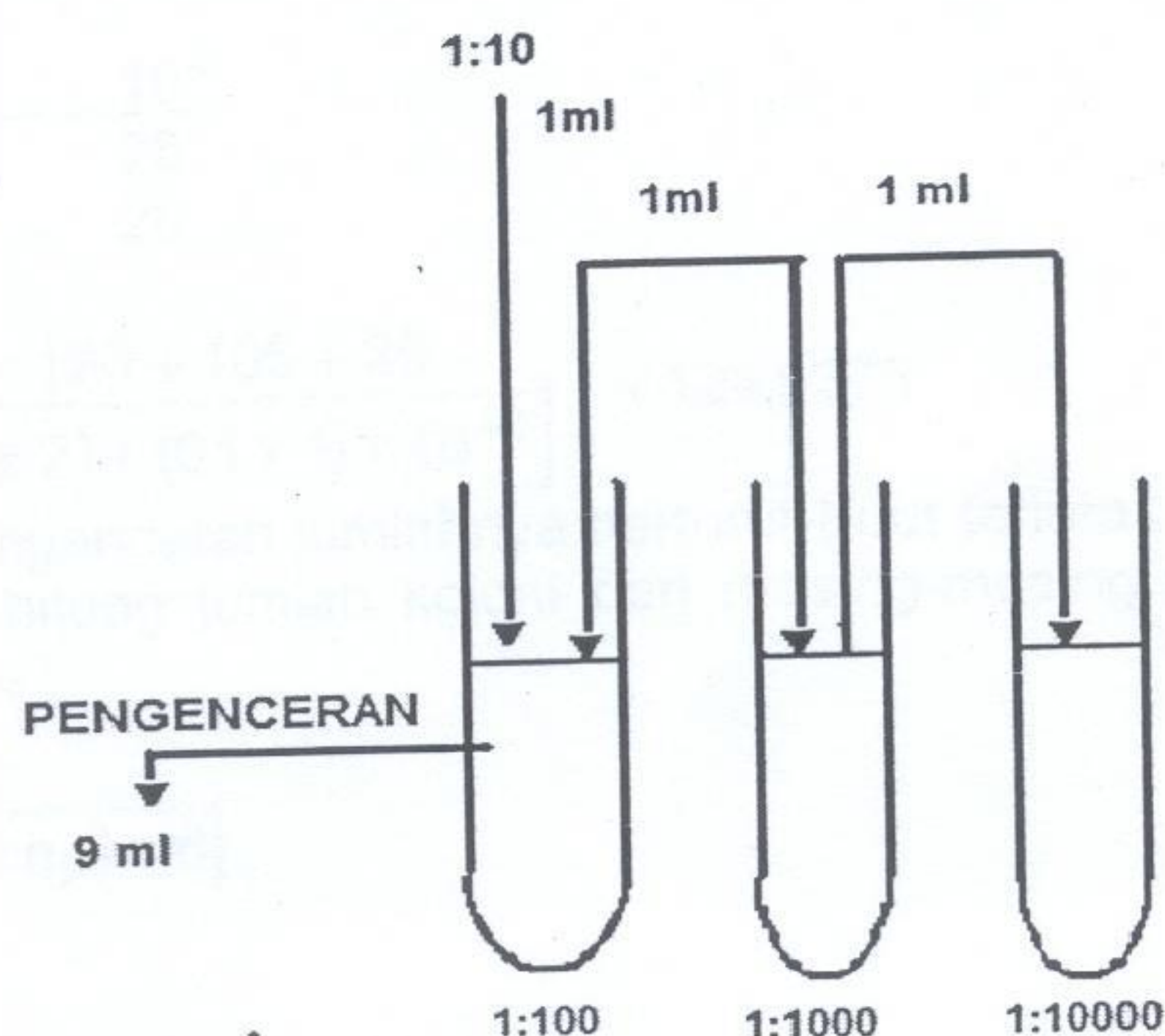
#### Plate count agar (PCA)

- tryptone 5 g
- yeast extract 2,5 g
- glukosa 1 g
- agar 15 g
- air suling 1 000 mL

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

### A.8.2.4 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada gambar A.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB);



**Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's phosphate Buffered Dilution Water* (BPB)**

- pipet masing-masing 1 mL dari tingkat pengenceran ( $10^{-1}$  sampai dengan  $10^{-4}$ ) ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- tuangkan 12 sampai dengan 15 mL media PCA yang masih cair dengan suhu ( $45 \pm 1$ ) °C ke dalam masing-masing cawan petri;
- goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan, dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;



- e) kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- f) biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- g) masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam; dan
- h) dan catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 48 jam.

#### A.8.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = n x F

##### Keterangan :

n adalah rata-rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g); dan

F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai

#### A.8.2.6 Pernyataan hasil

##### A.8.2.6.1 Cara menghitung

- a) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- b) jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni. Hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram.

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10 - 2]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n1) + (0,1 \times n2) \times d]}$$

##### Keterangan :

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri

n1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung

n2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua

d adalah pengenceran pertama yang dihitung



Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10 - 2]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- Jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan: jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6.4 \times 10^5)$

- Jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya : area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni per  $\text{cm}^2$

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	Area ( $\text{cm}^2$ )	Jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$>65 \times 10^3 \times 100 = >6500.000 (6.5 \times 10^6)$
~	6490	59	$>59 \times 10^3 \times 100 = >5900.000 (5.9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni perambat;
- Perambatan pada koloni ada 3 macam yaitu
- merupakan rantai yang tidak terpisah
  - perambat yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
  - perambatan yang terjadi pada pinggir atau penukaran pembenihan.
- Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.

#### A.8.2.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),



- a) jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas  
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya  $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan  
contohnya: 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya  $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
  - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil, dan  
Contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya  $5,8 \times 10^2$
  - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap  
Contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya  $5,6 \times 10^2$

### A.8.3 *Coliform* dan *Escherichia coli*

#### A.8.3.1 Prinsip

Pertumbuhan *Coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung *Durham*, sedangkan pertumbuhan *E.coli* diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

#### A.8.3.2 Peralatan

- a) Inkubator ( $35 \pm 1$ ) °C, terkalibrasi;
- b) Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, ( $45,5 \pm 0,2$ ) °C;
- c) Rak untuk tabung reaksi;
- d) Pipet ukur 10 mL dan 1 mL steril terkalibrasi, berskala 0,1 mL;
- e) Botol pengencer terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir plastik;
- f) Tabung reaksi dan tabung *Durham*; dan
- g) Jarum Ose dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

#### A.8.3.3 Pembenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth* / *lauryl tryptose (LT) broth*;
- b) *Brilliant green lactose bile (BGLB) broth* 2%;
- c) *Escherichia coli (EC) broth*;
- d) *Agar Levine's eosin methylene blue (L-EMB)*;
- e) *Plate count agar (PCA)*;
- f) *Gram stain*;
- g) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- h) Pereaksi Kovacs';
- i) *Methyl red – Voges Proskauer (MR – VP) broth*;
- j) Pereaksi *Voges Proskauer*;
- k) Larutan merah metil;
- l) *Koser's citrate broth*;
- m) *Peptone diluents* 0,1%;
- n) Pereaksi indol;
- o) Larutan kalium hidroksida, KOH 40%;
- p) *Butterfield's phosfat buffered dilution water (BPB)*;
- q) Larutan alfa naftol 5%; dan
- r) Kristal kreatin.

#### A.8.3.4 Cara kerja

##### A.8.3.4.1 APM - Uji pendugaan untuk *Coliform*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.8.1;



- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  dan  $10^{-3}$ ) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulphate tryptose* (LST) *broth* yang didalamnya terdapat tabung *Durham* terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama  $(48 \pm 2)$  jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- $(24 \pm 2)$ . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan positif;
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan negatif, lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi  $(48 \pm 2)$  jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

#### A.8.3.4.2 APM - Uji penegasan untuk *Coliform*

- a) Kocok tabung LST *broth* yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung BGLB *broth* 2% yang berlainan;
- c) masukkan tabung-tabung BGLB *broth* 2% ke dalam inkubator pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama  $(48 \pm 2)$  jam;
- d) Tentukan APM sesuai dengan Tabel A.2 berdasarkan jumlah tabung BGLB *broth* yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama  $(48 \pm 2)$  jam pada  $35^{\circ}\text{C}$ ; dan
- e) laporkan *Coliform* sebagai APM per gram.

#### A.8.3.4.3 APM – Uji penegasan untuk *Escherichia coli*

- a) Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung EC *broth* yang berlainan;
- b) inkubasikan tabung-tabung EC *broth* tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $(45,5 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$ , tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan positif;
- c) apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke- $(48 \pm 2)$ . Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan positif; dan
- d) lakukan uji lengkap terhadap semua tabung yang positif untuk uji penegasan.

#### A.8.3.4.4 APM - Uji lengkap untuk *Escherichia coli*

- a) Kocok tabung-tabung EC *broth* yang positif secara hati-hati;
- b) ambil koloni sebesar satu mata Ose, kemudian digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimal 0,5 cm;
- c) inkubasikan cawan agar L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu  $(35 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ ;
- d) periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna gelap dengan atau tanpa kilat logam;
- e) dari tiap cawan L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang diduga pada tabung agar miring PCA;



- f) inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu 35 °C dan gunakan untuk uji selanjutnya;
- g) buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E coli* adalah gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti dibawah ini, serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST *broth* untuk menegaskan adanya produksi gas,
- uji indol;
    - Inokulasi tabung *tryptone (trptophane) broth*;
    - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
    - uji terbentuknya indol dilakukan dengan menambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi *Kovacs'*; dan
    - uji indol adalah positif bila terbentuk warna merah pada lapisan atas.
  - uji *Voges Proskauer* ;
    - Inokulasi tabung medium MR-VP *broth* dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
    - pindahkan 1 mL biakan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril;
    - tambahkan 0,6 mL larutan alfa naftol 5% dalam alkohol, dan 0,2 mL larutan KOH 40% serta beberapa butir kristal kreatin; dan
    - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
  - uji merah metil;
    - Setelah uji *Voges Proskauer*, inkubasikan kembali tabung MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
    - tambahkan 5 tetes indikator merah metil pada setiap tabung; dan
    - uji merah metil adalah positif bila terbentuk warna merah, dan negatif bila terbentuk warna kuning.
  - uji sitrat;
    - Inokulasi tabung *Koser's citrate broth* dengan hati-hati menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan media. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain;
    - inkubasikan selama 96 jam pada suhu 35 °C; dan
    - uji sitrat adalah positif bila terbentuk kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dalam tabung.
  - uji pembentukan gas dari lactase.
    - Inokulasikan tabung LST *broth* dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C; dan
    - periksa tabung-tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.



## A.8.3.4.5 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.1 - Reaksi biokimia *Escherichia Coli* pada uji IMVIC

<i>E. coli</i>	Indol	Merah metil	<i>Voges Proskauer</i>	Sitrat
Varietas I	+	+	-	-
Varietas II	-	+	-	-

- Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila :
  - uji IMVIC mengikuti pola + + - - atau - + - - sesuai dengan Tabel A.1
  - pewarnaan Gram menunjukkan Gram negatif bentuk batang tidak berspora; dan
  - terbentuknya gas dalam *broth* dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C.
- Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel A.2 - APM/g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1 100
2	1	2	27	3	3	3	>1 100



#### A.8.4 *Salmonella* sp.

##### A.8.4.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

##### A.8.4.2 Peralatan

- a) Inkubator terkalibrasi,  $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ;
- b) Inkubator *refrigerated* atau *laboratory refrigerator* terkalibrasi,  $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$
- c) Otoklaf terkalibrasi;
- d) Oven terkalibrasi;
- e) Penangas air,  $(49 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;
- f) Penangas air, bersirkulasi, thermostat,  $(43 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ ;
- g) Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*,  $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ ;
- h) Neraca, kapasitas 2 000 gram terkalibrasi, dengan ketelitian 0,1 gram;
- i) Neraca, kapasitas 120 gram terkalibrasi, dengan ketelitian 5 mg;
- j) Blender dengan kecepatan putaran 10 000 -12 000 rpm dan blender jar (botol) steril;
- k) Botol bertutup ulir bermulut lebar 16 oz (500 mL) steril, Erlenmeyer 500 mL steril, *beaker*, 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- l) *Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- m) Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- n) Cawan petri steril, 15 x 100 mm, kaca atau plastik;
- o) Pipet steril, 1 mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 10 dan 5 mL terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mL;
- p) Jarum ose (diameter  $\pm 3$  mm), *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) Tabung reaksi atau tabung kultur steril, 10 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- r) Botol pengencer 1 000 mL;
- s) Rak tabung reaksi atau rak tabung kultur;
- t) Vorteks mixer;
- u) Lampu ( untuk mengamati reaksi serologi);
- v) *Bunsen burner*;
- w) Kertas pH (kisaran pH 6-8) dengan ketelitian maksimum 0,4 unit pH per perubahan warna;
- x) pH meter;
- y) Kantong plastik steril, 28-37 cm dapat diikat;
- z) *Beaker* plastik, 4 liter, dapat diotoklaf, untuk menyangga kantong plastik selama pengocokan dan inkubasi.
- â) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril;

##### A.8.4.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Universal preenrichment broth*;
- b) *Tetrathionate (TT) broth*;
- c) *Rappaport-Vassiliadis (RV) medium* (*RV medium* harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi *RV medium* tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- d) *Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar*;



- e) *Hektoen enteric* (HE) agar;
- f) *Bismuth sulfite* (BS) agar;
- g) *Triple sugar iron* (TSI) agar;
- h) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- i) *Trypticase (tryptic) soy broth*;
- j) *Trypticase soy broth* dengan *ferrous sulfate*;
- k) *Trypticase soy-tryptose broth*;
- l) *Methyl Red - Voges Proskeaur* (MR-VP) broth
- m) *Simmons citrate agar*;
- n) *Urea broth*;
- o) *Urea broth (rapid)*;
- p) *Malonate broth*;
- q) *Lysine iron agar* (LIA) (Edward dan Fife)
- r) *Lysine decarboxylase broth*;
- s) Medium uji motilitas (semi padat);
- t) Kalium sianida (KCN) broth;
- u) *Phenol red carbohydrate broth*;
- v) *Purple carbohydrate broth*;
- w) *MacConkey agar*;
- x) *Nutrient broth*;
- y) *Brain heart infusion* (BHI) broth;
- z) Larutan papain, 5 %;
- aa) Larutan selulosa, 1 %;
- bb) *Tryptose blood agar base*;
- cc) Bubuk kalium sulfit, anhidrat;
- dd) Larutan *chlorine*, 200 ppm, mengandung 0,1 % *sodium dodecyl sulfate*;
- ee) Etanol, 70 %;
- ff) Pereaksi Kovacs';
- dd) Pereaksi uji Voges-Proskauer (VP);
- hh) Kristal *creatine phosphate*;
- ii) Larutan kalium hidroksida, 40 %;
- jj) Larutan natrium hidroksida 1 N;
- kk) Asam hidroklorat 1 N;
- ll) Larutan *brilliant green dye*, 1 %;
- mm) Larutan *bromcresol purple dye*, 0,2 %;
- nn) Indikator merah metil;
- oo) Air suling steril;
- pp) Larutan *physiological saline*, 0,85 % (steril);
- qq) Larutan *formalinized physiological saline*;
- rr) *Salmonella polyvalent somatic* (O) antiserum;
- pp) *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antiserum;
- qq) *Salmonella somatic group* (O) antisera: A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub>, F, G, H, I, Vi, atau kelompok lain yang sesuai;
- uu) *Salmonella* Spicer-Edwards *flagellar* (H) antisera;

#### A.8.4.4 Cara Kerja

##### A.8.4.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Pipet 100 mL contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 900 mL *universal preenrichment broth* steril. Kocok selama 2 menit;
- b) pindahkan secara aseptik ke dalam botol pengencer 1 000 mL dan biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup, kemudian kocok perlahan;
- c) tambahkan 0,45 mL larutan *Brilliant green dye* 1 %, kocok hingga tercampur merata; dan



- d) kendurkan tutup wadah secukupnya  $\frac{1}{4}$  putaran. Inkubasikan selama  $(24 \pm 2)$  jam pada  $35^\circ\text{C}$ .

#### A.8.4.4.2 Pengkayaan (*enrichment*)

- Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan kedalam 10 mL media *Rappaport-Vassiliadis* (RV) dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL *tetrathionate* (TT) *broth* dan vortex masing-masing campuran tersebut; dan
- inkubasikan media RV pada suhu  $(42 \pm 0,2)^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam dan TT *broth* pada  $(35 \pm 2,0)^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam dalam penangas air bersirkulasi.

#### A.8.4.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum ose, goreskan sepanjang 3 mm biakan pengkayaan TT *broth* ke dalam cawan petri yang berisi media XLD, HE dan BS agar. Siapkan BS agar sehari sebelum digunakan dan simpan ditempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores.
- ulangi cara di atas dari media pengkayaan RV;
- inkubasikan cawan-cawan BS, HE dan XLD selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$ ;
- amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp.;  
Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:

Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah  $(24 \pm 2)$  jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella* sp. adalah sebagai berikut:

XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.

HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.

BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.

- jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BS setelah inkubasi  $(24 \pm 2)$  jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama  $(24 \pm 2)$  jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BS setelah inkubasi  $(48 \pm 2)$  jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas;
- dengan menggunakan jarum inokulasi steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan kedalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena *reaksi Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu  $(5 - 8)^\circ\text{C}$ ;
- inkubasi TSI dan LIA pada suhu  $35^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya  $\text{H}_2\text{S}$  yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella* sp. yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada bagian miring dan asam (kuning) pada tusukan, dengan atau tanpa  $\text{H}_2\text{S}$  (warna kehitaman pada agar). Pada LIA kultur *Salmonella* sp. yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai



- kultur negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur *Salmonella* sp. membentuk H<sub>2</sub>S pada agar miring LIA; Beberapa kultur non *Salmonella* sp. membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;
- h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan potensial sebagai *Salmonella* sp. sp. dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan pada media LIA dan alkalin pada bagian miringnya dan reaksi asam pada tusukan di TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella* sp. dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media LIA dan asam pada bagian miringnya, dan reaksi asam pada tusukannya di media TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. Bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* sp. (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai pasal f di atas; dan
- i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
- tiga kultur presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BS) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga kultur presumtif yang diinokulasikan dari RV;
  - jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 100 mL contoh minuman.

#### A.8.4.5 Identifikasi *Salmonella* sp.

##### A.8.4.5.1 Kultur campuran

- a) Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali kedalam media *MacConkey* agar, HE agar atau XLD broth. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C. Amati koloni yang diduga *Salmonella* sp. :
- *Mac Conkey* agar. Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* sp. akan membentuk area yang terang dari pengendapan *bile* disebabkan oleh bakteri lain yang muncul atau tumbuh;
  - *hektoen enteric* (HE) agar. Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam;
  - *xylose lysine desoxycholate* (XLD) agar. Koloni merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella* sp. pada media TSI dan LIA seperti pada pasal 8.5.4.3.f dan lanjutkan seperti pada pasal 8.5.4.3.g.

##### A.8.4.5.2 Kultur murni

- a) Uji urease (konvensional); dan  
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dengan jarum inokulasi ke dalam *urea broth*. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C; dan
- b) uji urease (cepat).  
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dengan jarum inokulasi ke dalam *rapid urea Broth*. Inokulasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu (37 ± 0,5) °C. Reaksi *Salmonella* sp. yang khas untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna).



#### A.8.4.5.3 Pengujian kultur urease negatif

- a) *Lysine decarboxylase (LD) broth*;  
 Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 ose dari TSI dan inokulasikan kedalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella sp.* memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.
- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*; dan inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  yang amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella sp.* memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung Durham dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung Durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- c) *Tryptone (tryptophane) broth (TB)*;  
 Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:
- *Potassium cyanida (KCN) broth*  
 Pindahkan 1 sengkeli biakan dari TB 24 jam kedalam media *KCN broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan lapiisi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella sp.* tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.
  - *malonate broth*  
 Pindahkan 1 sengkeli dari biakan TB kedalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *Malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *Malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.
  - uji indol  
 Dari media TB yang tersisa pindahkan 5 mL kultur ke dalam tabung reaksi steril, tambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi *kovacs'*. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan kultur sebagai bukan *Salmonella sp.* bila reaksi indol positif dan *flagellar (H)* negatif, atau KCN positif dan LDB negatif;



**A.8.4.5.4 Uji serologi *polyvalent flagellar* (H)**

- a) Inokulasi dari masing-masing TSI *agar* yang memberikan reaksi urease negatif kedalam:
  - BHI *broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35 °C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau
  - *trypticase soy trypticase* (TST) *broth* dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 mL larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 mL kultur di atas.
- b) siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah *diberi formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan ± 0,5 mL larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 mL antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 mL *formanilized physiological saline* dengan 0,5 mL *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C sampai dengan 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.
  - Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
  - negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol; dan
  - non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

**A.8.4.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic* (o)**

- a) Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 mL 0,85% *saline* menggunakan jarum ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- d) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (o) *antiserum* ke dalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- f) klasifikasi uji *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
  - Positif : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
  - negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*;
  - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

**A.8.4.5.6 Uji biokimia tambahan**

Nyatakan sebagai *Salmonella sp.*, kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada Tabel 6 butir 1-11. Jika 1 kultur TSI dari setiap 100 mL contoh menunjukkan *Salmonella sp.*, uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella sp.* pada uji biokimia, harus dimurnikan seperti pada pasal 8.5.5.1 diatas dan uji kembali pada pasal 8.5.4.5.2.



Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel A.3 :

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
  - Inokulasi broth ini dengan kultur TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ , tetapi amati setelah 24 jam;
  - nyatakan positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung Durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung Durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;
  - jika kultur memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.*, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.
- b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;
 

Ikuti prosedur seperti pada pasal 8.5.4.5.6.a. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.* pada kultur yang memberikan reaksi positif uji sukrosa, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- c) Merah metil-Voges-Proskauer (MR-VP) *broth*;
 

Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ ;

Lakukan uji *Voges-Proskauer* (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :

- Pindahkan 1 mL MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam kedalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ ;
- Tambahkan 0,6 mL *alpha naphthol* dan aduk;
- Tambahkan 0,2 mL larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam; dan
- Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi VP negatif.

Uji merah metil (MR)

- Tambahkan 5 tetes sampai dengan 6 tetes indikator merah metil ke dalam 5 mL media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam;
- amati hasilnya dengan segera; dan
- umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif.

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.* kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.

- d) *Simmons citrate agar*.
  - Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring dan menusuk bagian tegak. Inkubasikan selama  $(96 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ ;
  - nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan hasil sitrat positif;
  - negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.



#### A.8.4.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* sp. kultur-kultur yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel A.3. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* sp. kultur-kultur yang memberikan reaksi seperti pada Tabel A.4. Bila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* sp. pada uji biokimia, lakukan uji biokimia mulai dari pasal 8.5.5.3 terhadap kultur yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

**Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella* sp.**

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp. reaksi species <sup>a</sup>
		Positif	Negatif	
1.	Glukosa (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2.	<i>Lysine decarboxylase</i> (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3.	H <sub>2</sub> S (TSI dan LIA)	Hitam	tidak hitam	+
4.	Urease	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5.	<i>Lysine decarboxy broth</i>	warna ungu	warna kuning	+
6.	<i>Phenol red dulcitol broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ <sup>b</sup>
7.	<i>KCN broth</i>	pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8.	<i>Malonate broth</i>	warna biru	tidak berubah warna	- <sup>c</sup>
9.	Uji indol	permukaan bewarna nila	permukaan bewarna kuning	-
10.	Uji <i>Polyvalent flagellar</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
11.	Uji <i>Polyvalent somatic</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
12.	<i>Phenol red lactose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- <sup>c</sup>
13.	<i>Phenol red sucrose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	Uji <i>Voges-Proskauer</i>	merah muda sampai merah	tidak berubah warna	-
15.	Uji merah metil	merah menyebar	kuning menyebar	+
16.	<i>Simmons citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V

**Keterangan:**  
<sup>a</sup>+ adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari;  
 - adalah 90% atau lebih negatif dalam satu atau dua hari;  
 V adalah variabel;  
<sup>b</sup> adalah mayoritas dari kultur *Salmonella arizonae*: negatif;  
<sup>c</sup> adalah mayoritas dari kultur *Salmonella arizonae*: positif.



Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella* sp.

No	Substrat uji	Hasil
1	<i>Urease</i>	positif (warna ungu-merah)
2	Uji <i>indole</i> dan <i>polivalent flagellar</i> (H) atau uji <i>indole</i> dan uji Spicer-Edwards <i>flagellar</i>	positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan) positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>Lysine decarboxylase</i> dan <i>KCN broth</i>	positif (ada pertumbuhan) negatif (warna kuning)
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) <sup>a,b</sup>
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) <sup>b</sup>
6	<i>KCN broth</i> , uji <i>Voges-Proskauer</i> , dan merah metil	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)
<b>Keterangan:</b> <sup>a</sup> adalah uji <i>malonate broth</i> lebih lanjut pada biakan yang positif untuk menentukan <i>Salmonella arizonae</i> <sup>b</sup> adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella</i> sp., uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella</i> sp..		

### A.8.5 *Staphylococcus aureus*

#### A.8.5.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada pembenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulase.

#### A.8.5.2 Peralatan

- Inkubator 35 °C terkalibrasi;
- Oven terkalibrasi;
- Spreader* steril dari gelas;
- Botol pengencer 500 mL;
- Tabung reaksi;
- Gelas ukur 10 mL dan 1 mL terkalibrasi;
- Cawan petri;
- Gelas sediaan;
- Pipet ukur terkalibrasi; dan
- Jarum ose/inokulasi.

#### A.8.5.3 Pembenihan dan pereaksi

- Baird-parker* agar;
- Brain heart infusion broth* (BHIB); dan
- Plasma kelinci.

#### A.8.5.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada 8.1;
- pipet masing-masing 0,3 mL; 0,3 mL; 0,4 mL larutan contoh dari setiap seri pengenceran ke dalam masing-masing ke 3 cawan petri yang berisi media BPA;



- c) sebarakan contoh secara merata dengan menggunakan *spreader* steril. Tahan cawan dalam posisi tegak lurus sampai contoh diserap oleh medium ( $\pm$  10 menit). Jika contoh tidak mudah diserap oleh medium, tempatkan cawan petri pada posisi tegak lurus di dalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan petri dibalik;
- d) inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam; dan
- e) pilih cawan petri yang mengandung 20 koloni sampai 200 koloni dan hitung tersangka koloni *Staphylococcus aureus*, yaitu koloni berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya dan sering kali lingkaranm jernih, koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum ose.

#### A.8.5.5 Uji koagulase

- a) Pindahkan 5 koloni sampai dengan 10 koloni tersangka ke dalam tabung berisi 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB);
- b) inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam;
- c) tambahkan koagulasi plasma kelinci sebanyak 0,5 mL ke dalam kultur BHIB dan campur;
- d) inkubasikan campuran plasma kelinci dengan biakan BHIB pada 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam dan memeriksanya, setelah 6 jam akan terbentuk penggumpalan. Hanya bentuk yang kokoh dan sempurna serta dapat bertahan di dalam wadahnya ketika tabung dibalikkan disebut sebagai positif *Staphylococcus aureus*;
- e) amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi, lanjutkan inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, dan amati kembali ada tidaknya koagulasi;
- f) ratakan koloni (n) dari ketiga cawan petri yang diwakili oleh koloni-koloni yang memberikan reaksi penggumpalan dan dikalikan dengan faktor pengencernya; dan
- g) hitung jumlah *Staphylococcus aureus* dalam 1 g contoh.

#### A.8.5.6 Perhitungan

Angka *Staphylococcus aureus* (koloni/g) =  $n \times F$

Angka *Staphylococcus aureus* (koloni/25 g) =  $n \times F \times 25$

#### A.8.6 *Bacillus cereus*

##### A.8.6.1 Prinsip

Pertumbuhan *Bacillus cereus* ditandai dengan terbentuknya koloni eosin merah muda penghasil *lechitinase*, yang diikuti dengan uji konfirmasi pada berbagai media.

##### A.8.6.2 Peralatan

- a) Lemari pengering (inkubator) terkalibrasi, (30 $\pm$ 2) °C dan (35 $\pm$ 2) °C;
- b) Alat homogenisasi yang sesuai dengan kecepatan putaran 18 000 rpm sampai dengan 21 000 rpm;
- c) Penangas air, (48 - 50) °C;
- d) Mikroskop, mikroskop *slide* dan tutup;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) *Vortex mixer*;
- g) *Bunsen burner* lebar dan kecil;
- h) Rak tabung biakan;
- i) Botol steril;
- j) Tabung *anaerobic* BBL Gaspak, dengan H<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub> *generator envelopes* dan katalis;
- k) Tabung biakan 13 x 100 mm steril;
- l) Pipet Ukur 1 mL, 5 mL dan 10 mL terkalibrasi;
- m) Cawan petri steril 15 x 100 mm;



- n) Batang penyebar steril diameter 3-4 mm dengan area penyebar 45 - 55 mm;
- o) Jarum inokulasi (ose) dari kawat nichrome atau platina dengan diameter dalam 2 - 3 mm; dan
- p) Pena penahan (*marking pen*) hitam.

#### A.8.6.3 Media dan pereaksi

- a) *Mannitol-egg yolk-polymyxin* (myp) agar plates;
- b) *Egg yolk emulsion* 50%;
- c) *Trypticase soy-polymyxin broth*;
- d) Larutan polimiksin b untuk myp agar 0,1% dan *Trypticase soy-polymyxin broth* 0,15%;
- e) Lisozyme 0,001%;
- f) *Phenol red glucose broth*;
- g) *Tyrosine agar*;
- h) *Lysozyme broth*;
- i) *Voges-proskauer medium*;
- j) *Nutrient broth*;
- k) *Nitrate broth*;
- l) *Nutrient agar* untuk *Bacillus cereus*;
- m) *Sulfanilic acid reagent*;
- n) *Alfa naphtol reagent*;
- o) *Butterfield's phosphate-buffered dilution water* yang disterilkan dalam botol dengan volume akhir (450 ± 5) mL dan (90 ± 2) mL;
- p) *Voges-proskauer test reagents*;
- q) Buffer fosfat;
- r) Larutan kalium hidroksida 40%;
- s) Kristal keratin; dan
- t) Metanol.

#### A.8.6.4 Persiapan contoh

- a) Secara aseptik, timbang 50 g contoh ke dalam blender yang bersih dan steril. Tambahkan 450 mL *Butterfield's phosphate-buffered dilution water* (1:10) dan kocok selama 2 menit pada kecepatan tinggi (18 000 – 21 000 rpm); dan
- b) buat seri pengenceran dengan menggunakan larutan *Butterfield's phosphate-buffered dilution water* (1:10).

#### A.8.6.5 Angka Lempeng Total- *Bacillus cereus*

- a) Buat tingkat pengenceran dari  $10^{-2}$  sampai dengan  $10^{-4}$  dengan memindahkan 10 mL contoh yang telah dihomogenkan ke dalam 90 mL larutan pengencer, aduk dengan kuat dan lanjutkan ke pengenceran  $10^{-4}$ ;
- b) inokulasi sebanyak 0,1 mL masing-masing tingkat pengenceran (termasuk 1:10) menggunakan batang penyebar steril di atas permukaan media MYP agar, lakukan secara duplo;
- c) inkubasikan media MYP agar pada suhu 30 °C selama 24 jam;
- d) amati koloni yang dikelilingi oleh zona endapan yang menunjukkan bahwa *Bacillus cereus* menghasilkan *lecithinase* berwarna merah muda. Warnanya akan menjadi lebih jelas apabila inkubasi dilanjutkan;
- e) jika warna tidak jelas, lanjutkan inkubasi selama 24 jam lagi sebelum perhitungan koloni;
- f) pilih media yang mengandung perkiraan 15 koloni sampai dengan 150 koloni eosin merah muda penghasil *lecithinase*;
- g) beri tanda di bagian dasar cawan petri berdasarkan zona yang terbentuk menggunakan pena hitam untuk memudahkan perhitungan dan penjumlahan koloni *Bacillus cereus*;



- h) ambil 5 atau lebih koloni yang positif mengandung *Bacillus cereus* dari media MYP agar dan pindahkan ke media nutrient agar miring untuk konfirmasi *Bacillus cereus*; dan
- i) hitung jumlah *Bacillus cereus* per gram contoh berdasarkan persentase koloni yang telah diuji dan dikonfirmasi sebagai *Bacillus cereus*.

Contoh perhitungan :

Jika jumlah rata-rata yang diperoleh pada pengenceran  $10^{-3}$  adalah 65 dan 4 dari 5 koloni telah diuji dan dikonfirmasi sebagai *Bacillus cereus* maka jumlah sel *Bacillus cereus* per gram contoh adalah

$$65 \times 4/5 \times 1000 \times 10 = 520000$$

#### Keterangan

Faktor pengenceran lebih tinggi sepuluh kali dari pengenceran contoh sebab hanya 0,1 mL contoh diuji.

#### A.8.6.6 APM- *Bacillus cereus*

- a) Teknik APM direkomendasikan untuk menghitung *Bacillus cereus* dalam contoh yang diharapkan mengandung *Bacillus cereus* lebih kecil dari 10 per gram contoh.
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  dan  $10^{-3}$ ) kedalam tiga tabung *tryticase soy-polymyxin broth*;
- c) inkubasikan tabung-tabung tersebut dalam inkubator pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama  $(48 \pm 2)$  jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada jam ke-  $(48 \pm 2)$  untuk melihat pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus*;
- e) gores biakan dari tabung yang positif dengan ose ke dalam media MYP agar dan inkubasi selama 24 jam sampai dengan 48 jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ ;
- f) ambil 1 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan *lechitinase* positif dari media MYP agar dan pindahkan ke media nutrient agar miring untuk konfirmasi *Bacillus cereus*; dan
- g) konfirmasi *Bacillus cereus* dapat dilihat pada 8.5.7.8.

#### A.8.6.7 Uji penegasan untuk *Bacillus cereus*

##### A.8.6.7.1 Kultur campuran

- a) Ambil 5 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan *lechitinase* positif dari media MYP agar dan pindahkan ke media agar miring untuk konfirmasi *Bacillus cereus*;
- b) inkubasi selama 24 jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ ;
- c) lakukan pengamatan secara mikroskopis, disertai pewarnaan gram. *Bacillus cereus* akan tampak berbentuk batang besar, gram positif, dengan rantai pendek hingga panjang, spora berbentuk ellips, letaknya ditengah sampai sub terminal dan spora tersebut tidak menggembungkan sporangium;
- d) pindahkan 3 mm ose biakan dari setiap agar miring ke tabung (13 x 100) mm yang mengandung 0,5 mL larutan bufer fosfat steril kemudian dikocok dengan *vortex*, untuk mensuspensikan biakan; dan
- e) suspensi biakan ini digunakan untuk konfirmasi *Bacillus cereus* berikut.

##### A.8.6.7.2 Uji *phenol red glucose broth*

- a) Inokulasikan 3 mL suspensi biakan menggunakan jarum ose 2 mm;
- b) inkubasi tabung tersebut secara anaerobik selama 24 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  dalam tabung anaerobik GasPak; dan



- c) kocok tabung tersebut dengan kuat dan amati pertumbuhan *Bacillus cereus* yang ditandai oleh peningkatan kekeruhan dan perubahan warna dari merah ke kuning yang menunjukkan bahwa asam telah dihasilkan secara anaerobik dari glukosa. Perubahan warna dari merah ke oranye/kuning bisa terjadi pada sebagian tabung kontrol yang tidak diinokulasi. Hal ini disebabkan oleh terjadinya pengurangan pH akibat pemaparan media oleh CO<sub>2</sub> yang terbentuk dalam tabung anaerobik GasPak. Gunakan kontrol positif dan kontrol negatif untuk meyakinkan perbedaan antara reaksi positif dan positif palsu.

#### A.8.6.7.3 Uji *nitrate broth*

- Inokulasikan 5 mL suspensi biakan menggunakan ose 3 mm;
- inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- untuk uji nitrit, tambahkan 0,25 mL masing-masing pereaksi *sulfanilic acid* dan pereaksi *alfa naphthol* ke dalam setiap tabung; dan
- warna oranye yang terbentuk dalam 10 menit menunjukkan bahwa nitrat telah direduksi menjadi nitrit.

#### A.8.6.7.4 Uji *modified VP medium*

- Inokulasikan 5 mL suspensi biakan menggunakan ose 3 mm;
- inkubasi tabung tersebut selama (48±2) jam pada suhu 35 °C;
- untuk uji *acetylmethyl-carbinol*, pipet 1 mL biakan ke dalam tabung uji (16 x 125) mm, tambahkan 0,6 mL larutan *alfa naphthol*, dan 0,2 mL kalium hidroksida (KOH) 40%;
- aduk dan tambahkan sedikit kristal kreatin;
- amati setelah didiamkan selama 1 jam pada suhu ruang; dan
- uji positif apabila terbentuk warna ungu.

#### A.8.6.7.5 Uji *tyrosine agar*

- Inokulasikan suspensi biakan dengan ose 3 mm ke seluruh permukaan media miring agar tirosin;
- inkubasi media miring tersebut selama 48 jam pada suhu 35 °C;
- amati zona bening yang terbentuk yang menunjukkan bahwa tirosin telah terdekomposisi; dan
- jika hasil uji negatif maka inkubasi dilanjutkan selama 7 hari sebelum hasil dinyatakan negatif.

#### A.8.6.7.6 Uji *lysozyme broth*

- Inokulasikan 2,5 mL *nutrient broth* yang mengandung 0,001% lisozim dengan 2 mm ose suspensi biakan;
- inokulasikan juga 2,5 mL *nutrient broth* tanpa mengandung 0,001% lisozim sebagai kontrol positif;
- inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- uji pertumbuhan dalam *lysozyme broth* dan dalam kontrol *nutrient broth*; dan
- inkubasi tabung negatif selama 24 jam lagi sebelum dibuang.

#### A.8.6.7.7 Uji *MYP agar*

- Bagi bagian dasar cawan petri menjadi 6 bagian sampai dengan 8 bagian yang sama menggunakan pena;
- inokulasikan di setiap bagian MYP agar tersebut dengan cara menyentuh permukaan MYP agar dengan 2 mm ose yang berisi kultur secara hati-hati. Dalam satu petri dapat diuji 6 atau lebih kultur;



- c) biarkan inokulum diserap sempurna sebelum diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- d) amati terbentuknya *lechitinase* yang ditunjukkan oleh zona endapan disekitar pertumbuhan;
- e) manitol tidak difermentasi oleh isolat jika pertumbuhan dan disekitar media berwarna eosin merah muda. Warna kuning menunjukkan bahwa asam diproduksi dari manitol; dan
- f) koloni *Bacillus cereus* biasanya positif *lechitinase* dan negatif manitol pada MYP agar.

#### A.8.6.7.8 Hasil uji konfirmasi *Bacillus cereus*

Konfirmasi *Bacillus cereus* apabila :

- a) Menghasilkan gram positif dengan spora yang tidak sebesar sporangium;
- b) menghasilkan *lechitinase* dan tidak memfermentasikan manitol dalam media MYP agar;
- c) tumbuh dan menghasilkan asam dari glukosa secara anaerobik;
- d) mereduksi nitrat menjadi nitrit;
- e) menghasilkan *acetylmethylcarbinol*;
- f) menguraikan *L-tyrosine*; dan
- g) tumbuh dalam *lysozyme* 0,001%.

#### A.8.7 Kapang dan khamir

##### A.8.7.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu  $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 5 hari.

##### A.8.7.2 Peralatan

- a) Mikroskop;
- b) Inkubator 25 °C terkalibrasi;
- c) Alat penghitung koloni;
- d) Penangas air  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;
- e) Cawan petri 15 mm x 100 mm; dan
- f) Pipet ukur 1 mL dan 10 mL terkalibrasi.

##### A.8.7.3 Pembenihan dan pengencer

Pilihan penggunaan media :

- a) Media dengan penambahan larutan antibiotik;
  - *dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC) agar;
  - *dichloran 18% glycerol* (DG 18) agar;
 antibiotik ditambahkan di media kapang untuk mencegah pertumbuhan bakteri. Konsentrasi antibiotik yang diizinkan adalah 100 mg per liter media. Jika tampak pertumbuhan bakteri, siapkan media dengan penambahan 50 mg per liter *chloramphenicol* sebelum otoklaf dan 50 mg per liter *chlortetracycline* steril saat media mulai dikondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.
- b) *Plate count agar* (PCA);  
 Tambahkan 100 mg *chloramphenicol* per liter jika menggunakan media ini. Media ini tidak cocok jika diduga ada kapang *spreader* (contoh *Mucor*, *Rhizopus* dll);
- c) *Malt agar* (MA)
- d) *Malt extract agar* (kapang) (MEAYM); atau



e) *Potato dextrose agar* (PDA) :

- infusion from white potatoes 200g
- dextrose 20g
- agar 20g
- air suling 1 000 mL

Larutkan semua bahan di atas. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit. Sebelum dipergunakan dinginkan sampai 50 °C dan pH diatur 3,5 dengan asam tartrat 10% steril. Penurunan pH dapat diganti dengan penambahan 4 mL antibiotik (1 g/100 mL). Campurkan, kemudian tuangkan ke dalam cawan petri.

**A.8.7.4 Cara kerja**

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai 8.1;
- b) terdapat dua metode persiapan media dalam cawan, yaitu :
  - metode menyebar pada cawan (untuk pilihan media DRBC dan DG 18):  
pipet 0,1 mL masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media padat dan sebarkan merata dengan menggunakan batang gelas.
  - metode menuang pada cawan (untuk pilihan media DG 18):  
pipet 1,0 mL masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri 15 mm x 100 mm dan sesegera mungkin tuangkan 20 mL sampai dengan 25 mL media. Campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam dalam jangka waktu 1 menit sampai dengan 2 menit.
- c) biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku;
- d) pipet masing-masing 1 mL dari pengenceran  $10^{-1}$  sampai dengan  $10^{-2}$  ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- e) masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator dan inkubasi pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari;
- f) hitung koloni kapang (perhitungan dapat dilakukan mulai hari ke tiga sampai dengan hari ke lima). Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam; dan
- g) nyatakan hasil perhitungan sebagai jumlah kapang per gram contoh.

**A.8.7.5 Pernyataan hasil****A.8.7.5.1 Cara menghitung**

Cara menghitung kapang dan khamir seperti cara menghitung pada angka lempeng total.

**A.8.7.5.2 Cara menghitung dan membulatkan angka**

Cara menghitung dan membulatkan angka kapang dan khamir seperti cara menghitung dan membulatkan angka pada angka lempeng total.



## Bibliografi

SNI 7387 : 2009 Batas Maksimum cemaran logam berat dalam pangan

SNI 7388 : 2009 Batas Maksimum cemaran mikroba dalam pangan

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 925.10, Solids (Total) and Moisture in Flour, Air Oven Method*, 18<sup>th</sup> Edition, 2005, Current through revision 1.2006, Chapter 32.1.03

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 948.13A, Protein (crude) in Wheat*, 18<sup>th</sup> Edition, 2005, Current through revision 1.2006, Chapter 32.1.22B.

American Oil Chemistry Society, 1993. *AOCS Official Method Ca 5a-40. Free Fatty Acids* 4<sup>th</sup> Edition

Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.09

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21 Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, Chapter 9.2.22

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 974.14 Mercury in Fish, Alternative Digestion Method*, Chapter 9.2.24

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15 Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.01

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2003. *Food Sampling and preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Staphylococcus aureus*. Chapter 12.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Mold, Yeast and Mycotoxin*. Chapter 18.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2007. *Salmonella sp.*. Chapter 5.













**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.go.id](mailto:bsn@bsn.go.id)